

Family list

2 family member for:

JP10337173

Derived from 1 application.

1 MICROREACTOR FOR BIOCHEMICAL REACTION

Publication info: **JP3654481B2 B2** - 2005-06-02

JP10337173 A - 1998-12-22

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

MICROREACTOR FOR BIOCHEMICAL REACTION

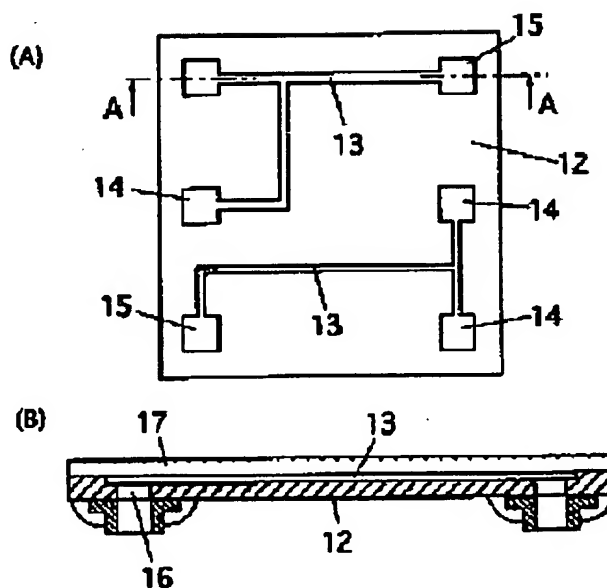
Patent number: JP10337173
Publication date: 1998-12-22
Inventor: FUJII TERUO; HOSOKAWA KAZUO; NOJIMA TAKAHIKO; ENDO ISAO; SHIYOUJI SHIYUUICHI
Applicant: RIKAGAKU KENKYUSHO
Classification:
- **International:** C12M1/00; C12N15/09
- **European:** B01F13/00M; B01J19/00R
Application number: JP19970147964 19970605
Priority number(s): JP19970147964 19970605

Report a data error here

Abstract of JP10337173

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a microreactor for biochemical reaction capable of simultaneously carrying out a great number of biochemical reactions, for example, $\geq 1,000$ reactions in parallel and performing not only a simple analysis but also a synthetic reaction of a substance such as protein on a cell.

SOLUTION: This microreactor comprises plural independent chambers formed by anisotropic etching on the surface of a single silicon base 12 and a flat plate 17 (heat-resistant glass) which is subjected to anode bonding on the surface of the silicon base 12 to seal up the reaction chambers. The reaction chambers have injection boats 14, an exhaust boat 15 and a channel 13 communicating with these boats. The injection boats 14 and the exhaust boat 15 are provided with through holes 16 communicating with the back of the silicone base, a reagent is injected through the through holes 16 to the injection boats 14 and discharged from the exhaust boat 15. Further, at least a part of the flat plate 17 is a transparent part and a reaction in the interior is optically observed through the transparent part.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-337173

(43) 公開日 平成10年(1998)12月22日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

// C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-147964

(22) 出願日 平成9年(1997)6月5日

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 藤井 輝夫

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72) 発明者 細川 和生

埼玉県川口市元郷4-20-8

(72) 発明者 野島 高彦

東京都練馬区田柄2-32-15-106

(74) 代理人 弁理士 堀田 実 (外1名)

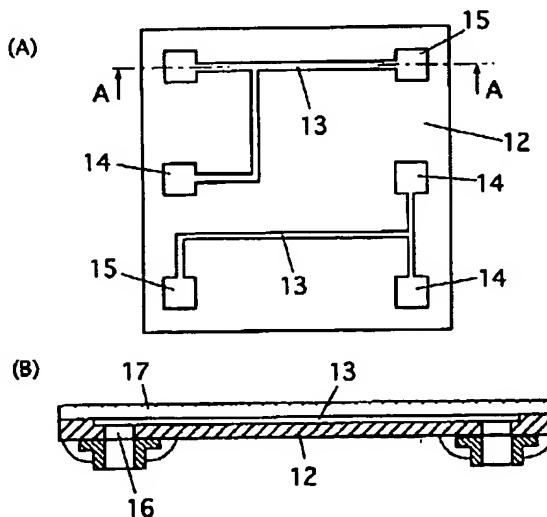
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学反応用マイクロリアクタ

(57) 【要約】

【課題】 例えば1000以上の多数の生化学反応を同時に並列的に行うことができ、かつ、単なる分析だけではなく、蛋白質合成などの物質合成反応をもセル上で行うことができる生化学反応用マイクロリアクタを提供する。

【解決手段】 単一のシリコン基板12の表面に異方性エッチングにより形成された複数の独立した反応チャンバ11と、シリコン基板12の表面に陽極接合され反応チャンバ11を密閉する平板17(耐熱ガラス)とからなる。反応チャンバ11は、注入ポート14及び排出ポート15と、これを連通するチャンネル13とを有する。また、注入ポートと排出ポートは、シリコン基板の裏面に連通する貫通孔16を備え、この貫通孔を通して注入ポートへ試薬を供給し、かつ排出ポートから排出するようになっている。更に、平板17の少なくとも一部が透明部であり、この透明部を通して内部の反応を光学的に観察するようになっている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 シリコン基板の表面に異方性エッチングにより形成された複数の独立した反応チャンバと、該シリコン基板の表面に陽極接合され前記反応チャンバを密閉する平板とからなる、ことを特徴とする生化学反応用マイクロリアクタ。

【請求項2】 前記反応チャンバは、注入ポート及び排出ポートと、該注入ポートと排出ポートを連通するチャンネルとを有し、注入ポートと排出ポートは、シリコン基板の裏面に連通する貫通孔を備え、該貫通孔を通して注入ポートへ試薬を供給し、かつ排出ポートから排出するようになっている、ことを特徴とする請求項1に記載の生化学反応用マイクロリアクタ。

【請求項3】 前記平板の少なくとも一部が透明部であり、該透明部を通して内部の反応を光学的に観察する、ことを特徴とする請求項1に記載の生化学反応用マイクロリアクタ。

【請求項4】 前記シリコン基板の一部に計測回路が構成されている、ことを特徴とする請求項1に記載の生化学反応用マイクロリアクタ。

【請求項5】 前記注入ポートは、発光酵素用の第1ポートと基質溶液用の第2ポートとからなり、前記チャンネルは、第1ポートと第2ポートを連通する合流用チャンネルと、該合流用チャンネルと排出ポートを連通する反応チャンネルとからなり、該反応チャンネル内での生物発光反応が透明部を通して光学的に観察される、ことを特徴とする請求項3に記載の生化学反応用マイクロリアクタ。

【請求項6】 前記注入ポートは、遺伝情報を有する核酸を含む混合液A用の第1ポートと混合液B用の第2ポートとからなり、前記チャンネルは、第1ポートと第2ポートを連通する合流用チャンネルと、該合流用チャンネルと排出ポートを連通する反応チャンネルとからなり、シリコン基板を外部より所定の温度に保持し、これにより反応チャンネル内で核酸上の遺伝暗号に従った蛋白質合成反応が生じる、ことを特徴とする請求項3に記載の生化学反応用マイクロリアクタ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、多数の生化学反応を同時に並列的に行うための生化学反応用マイクロリアクタに関する。

【0002】

【従来の技術】生化学実験においては、一般に μ Lオーダーの試薬を対象に分取、混合、反応、検出、分離等、多段階の煩雑な操作が必要とされる。特に蛋白質やRNA等不安定な物質を扱う場合には、温度や分解酵素対策など、実験環境への配慮も不可欠であり、実験の効率化を議論するどころか、実験技術の熟練度合いが、研究成果に少なからず影響を与える。

【0003】従来、かかる生化学実験では、多数（例え

ば48個）の反応チャンバにそれぞれ異なる試薬を入れ、全体を同時に同条件で処理して最適条件を検出する手法がとられていた。しかし、この手法をそのまま更に多数（例えば1000以上）の反応試験に適用しようとすると、試験装置が非常に大型となり、全体を同一条件で処理し検査することが不可能になる問題点があった。

【0004】一方、キャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis) など、1 mm以下のマイクロスケールの流路を用いることにより、装置を小型化し、分析を高速化することが従来から行われている (Proc. of HPCE '93, Orlando, 1993)。また、近年ではいわゆる MEMS (Microelectromechanical Systems) Technology (Proc. of MEMS '97, Nagoya, 1997) を化学分析や遺伝子解析に応用する研究として、例えば米国ではヒューマンゲノム計画の関連技術課題 ("Microfabrication Technology for Biomedical Applications", Cambridge Health Institute, 1996)、欧州では μ TAS ("Micro Total Analysis System", Kluwer Academic, 1995) などが議論されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】これらの研究において実現されている具体的システムは、主にDNA分子のハンドリング及び定量などをターゲットとした分析目的であり、そこではシステムのファブリケーションとインテグレーションに伴う技術課題が主な研究対象となっている。そのため上述した従来のシステムでは、蛋白質合成などの物質合成反応を含む広範囲の生化学実験には対応できなかった。

【0006】更に、米国特許第5, 589, 136号 ("SILICON-BASED SLEEVE DEVICES FOR CHEMICAL REACTIONS") には、図9に模式的に示すように、スリーブ反応チャンバと、このスリーブ反応チャンバ用の加熱手段とからなり、スリーブ反応チャンバは溝を有し、この溝にインサート又はライナーが挿入できるようになっているマイクロ化学反応器が開示されている。なお、この図で1はマイクロ化学反応器、1aは凹み、2は電源/制御システム、3は注射器、4はシリコンゴムの窓、5は電磁コイル、6, 7は電極、Cはコンデンサ、Lはコイルである。

【0007】しかし、このマイクロ化学反応器では、DNA反応、DNA増殖、DNA合成等ができるものの、多数（例えば1000以上）の反応器の集積化が困難であり、従って多数の生化学反応を同時に並列的に行うことが難しい問題点があった。

【0008】本発明は、上述した問題点を解決するために創案されたものである。すなわち、本発明の主目的は、例えば1000以上の多数の生化学反応を同時に並列的に行うことができる生化学反応用マイクロリアクタを提供することにある。また、本発明の別の目的は、単なる分析だけではなく、蛋白質合成などの物質合成反応

をもセル上で行うことができる生化学反応用マイクロアクタを提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、シリコン基板の表面に異方性エッチングにより形成された複数の独立した反応チャンバと、該シリコン基板の表面に陽極接合され前記反応チャンバを密閉する平板とからなる、ことを特徴とする生化学反応用マイクロアクタが提供される。

【0010】上記本発明の構成によれば、シリコン基板上に平板で密閉された独立した複数の反応チャンバを有するので、各反応チャンバで複数の生化学反応を同時に並列的に行うことができる。特に、この反応チャンバは、シリコン基板の表面に異方性エッチングにより形成されているので、例えば4mm×10mmで1つの反応チャンバを構成すれば、30cm直径の単一シリコンウエハ上に1000以上の反応チャンバを形成することができる。従って、この一枚のシリコンウエハ内で1000以上の生化学反応を同時に並列的に行うことにより、全体を同一条件で処理し検査して最適条件を容易に決定することができる。また、各反応チャンバを動物の細胞に匹敵する大きさにできるので、細胞内に近い環境にすることも可能となり、単なる分析だけではなく、蛋白質合成などの物質合成反応をもセル上で行うことができる。

【0011】本発明の好ましい実施形態によれば、前記反応チャンバは、注入ポート及び排出ポートと、該注入ポートと排出ポートを連通するチャネルとを有し、注入ポートと排出ポートは、シリコン基板の裏面に連通する貫通孔を備え、該貫通孔を通して注入ポートへ試薬を供給し、かつ排出ポートから排出するようになっている。この構成により、異なる種々の試薬を注入ポートへ連続して供給し、異なる反応を長時間同時に並列的に行うことができる。

【0012】また、前記平板の少なくとも一部が透明部であり、該透明部を通して内部の反応を光学的に観察できるようになっている。この構成により、高感度フィルムやCCDカメラ等を用いて多数の反応チャンバ内での反応を同時に観察することができ、画像処理等により最適セルを容易に検出することができる。

【0013】更に、シリコン基板の一部に計測回路が構成されている、ことが好ましい。この構成により、集積回路と同様の回路製造技術を用いて、各種センサー、温度調節器、発振器、等を組み込むことができ、多数の生化学反応を同時に並列的にを行い、かつ効率よく制御しデータを取得することができる。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明の好ましい実施形態を図面を参照して説明する。なお、各図において、共通する部分には同一の符号を付し、重複した説明を省略す

る。本発明は、上述した一般のワークベンチ上で行われる操作をマイクロシステム上で実現し、自動化、高速化することにより、大規模でシステムチックな実験を可能とするようなシステムの開発を目指すものである。以下、ワークベンチをマイクロ化するとの意味から、このシステムを「マイクロワークベンチ」(MicroWork Bench: MWB)と名付ける。

【0015】システムをマイクロ化するメリットとしては一般に、

①デッドボリュームが小さく、少量サンプルで高速に分析が可能である。

②小型、軽量な実験システムが実現できる。

③集積化、並列化が容易である。

④不純物の混入が抑えられる。

⑤システム化により、操作上のエラーを低減できる。などが考えられ、幅広い応用が期待できる。

【0016】図1は、本発明のマイクロリアクタの概念を模式的に示す図である。このマイクロリアクタは、溶液を混合して反応を行った後、定量及び分析してから分離するという一連の生化学実験操作をいくつかのセルの組み合わせによって実現する。図中では例えば、①リザーバセル(Reservoir Cell)、②混合セル(Mixing Cell)、③反応セル(Incubation Cell)、④検出セル(Detection Cell)、及び⑤分離セル(Separation Cell)の組み合わせの例を示している。

【0017】更に、マイクロファブリケーションの利点を活かして、これらのセルを更に集積化すれば、多段階の反応分離操作を並列に実行できるシステムが考えられ、例えば近年注目を集めている分子進化や組合せ化学(Combination Chemistry)など、広い範囲の生化学実験に対応可能なシステムが実現できる。

【0018】図2は、図1と同様の概念図である。この図に示すように、例えば4mm×10mmで1つの反応チャンバ11を構成すれば、30cm直径の単一シリコンウエハ上に1000以上の反応チャンバを形成することができる。従って、この一枚のシリコンウエハ内で1000以上の生化学反応を同時に並列的に行うことにより、全体を同一条件で処理し検査して最適条件を容易に決定することができる。なお、これは一例であり、反応チャンバ11を更に小さくすることにより、更に大量の反応を同時に行うことができる。

【0019】

【実施例】

(実施例1)図3は、本発明のマイクロリアクタの実施形態を示す図であり、(A)は平面図、(B)はA-A線における断面拡大図を示している。上述したようなシステムを実現するためには、液送、反応、検出、分離等にかかる要素技術に加えて、流路を含めたセル間の接続の問題やシステム全体としての制御の問題など様々な技術課題を解決する必要がある。こうした問題を検討する

ための第1段階として、図3に示すような2液を混合して反応を行うためのマイクロリアクタを製作した。

【0020】図3において、20mm×20mmのシリコン基板12上に異方性エッチングによって深さ $h=20\mu\text{m}$ のチャンネル13を掘り、それぞれサンプルの注入ポート14 (Inlet)を2つ、排出ポート15 (Outlet)を1つ設けた。チャンネル形状はT字型とh型の2種類、チャンネル幅 w については $200\mu\text{m}$ 、 $400\mu\text{m}$ 、 $800\mu\text{m}$ の3種類、計6種類のリアクタを製作した。

【0021】図4は、図3の製造方法を示す図である。この図に示すように、(A)まず、シリコン基板12上に異方性エッチングによってチャンネル13を加工する。異方性エッチングはマイクロマシーニング技術の1つであり、ウェットエッチングにおいて、アンダーカットが少ない高アスペクト比構造を得る技術である。これは、例えばKOHやエチレンジアミン水溶液をエッチング液とした結晶方位依存性エッチングによって達成することができる。

【0022】(B)次に、注入ポート14及び排出ポート15に裏面に連通する貫通孔16を設ける。この加工も、異方性エッチングによって行うことができる。

(C)次いで、シリコン基板12の表面に平板17を陽極接合する。この平板17は、少なくとも一部が透明部であることが好ましい。かかる透明部を設けることにより、透明部を通して内部の反応を光学的に観察することができる。

【0023】なお、平板17には、例えば耐熱ガラス(商標名:パイレックス)等を用いるのがよい。また、陽極接合は、通常 $300\sim 500^\circ\text{C}$ 程度に加熱した状態で、両者の間に電圧を加えて接合するものである。この陽極接合により、平板17で閉じられたチャンネル13が、反応チャンバ11として機能する。(D)最後に、ハトメ18をシリコン基板12の裏面に接着剤(例えばエポキシ系)を用いて接着する。

【0024】上述したように、本発明の生化学反応用マイクロリアクタは、シリコン基板12の表面に異方性エッチングにより形成された複数の独立した反応チャンバ11と、シリコン基板12の表面に陽極接合され反応チャンバ11を密閉する平板17とからなる。また、反応チャンバ11は、注入ポート14及び排出ポート15と、注入ポートと排出ポートを連通するチャンネル13とを有し、注入ポート14と排出ポート15は、シリコン基板の裏面に連通する貫通孔16を備え、この貫通孔16を通して注入ポート14へ試薬を供給し、かつ排出ポート15から排出するようになっている。また、平板17の少なくとも一部が透明部であり、この透明部を通して内部の反応を光学的に観察できるようになっている。更に、必要により、シリコン基板12の一部に計測回路(各種センサー、温度調節器、発振器、等)を構成する。

【0025】(第1実験例)図5は、図3のマイクロリアクタを用いた第1実験例である。実験の際には、この図に示すように注入ポート14及び排出ポート15の部分にシリコンチューブ19を接続し、マイクロシリンジ21からシリンジポンプなどを用いてサンプルを注入する。ジャンクション部分で2種のサンプルが接触し、ジャンクションより下流のチャンネル部分がリアクタとなってサンプル同士が反応する。なお、シリンジ21でサンプルを注入する際には、気泡等によって流れがブロックされることを避けるため、いわゆるブライミングを行ってリアクタ内部を液体で満たしておく必要がある。

【0026】マイクロシステムにおける生化学反応についての基礎的な検討を行う目的で、製作したマイクロリアクタ内において具体的反応実験を行った。図3に示したマイクロリアクタにおいて、注入ポート14は、ルシフェラーゼとルシフェリンの混合溶液用の第1ポート14aとATP溶液用の第2ポート14bとからなり、チャンネル13は、第1ポート14aと第2ポート14bを連通する合流用チャンネル13aと、この合流用チャンネル13aと排出ポート15を連通する反応チャンネル13bとからなる。また、反応チャンネル13b内でのホタルルシフェラーゼ反応が透明部を通して光学的に観察されるようになっている。

【0027】すなわち、本発明では比較的検出の容易な生化学反応として、ホタルルシフェラーゼによる発光反応を取り上げた。ホタルルシフェラーゼ反応は、ルシフェラーゼという酵素がルシフェリン及びATP(アデノシン三リン酸)を基質として反応が進む発光反応で、ルシフェリンの酸化に伴って光が発せられるため、チャンネル部分での発光強度をモニタすることにより、反応のアクティビティを知ることができる。

【0028】実験では、ATP検出に用いられるルシフェリン及びルシフェラーゼを含む検出試薬(Sigma#L0633)及びATP水溶液をそれぞれ注入ポートから注入した後、高感度フィルムを用いてリアクタの撮影を行うことにより、発光の観察を行った。

【0029】図6は、図5の試験結果を示す図である。撮影の結果、図6に示すように、リアクタ内で検出試薬とATPが徐々に混合し、発光していることが確認された。マイクロチャンネル内の液送等メカニカルな部分についても、蛋白溶液が目詰まりを起こすなどの問題もなく、単純な構造ではあるが、マイクロリアクタの実現に向けて多くの基礎的知見が得られた。

【0030】(第2実験例)図7は、図3のマイクロリアクタを用いた第2実施例である。蛋白質合成の可能性を評価するために、混合すると蛋白質を合成することが知られている2つの混合液A、Bを準備し、かつ混合液AにメッセンジャーRNA(mRNA)を含むものと、含まないものを試験した。すなわち、混合液Aとして、 $\text{L-}^{14}\text{C}$ -フェニルアラニン、ATP、GTP、m

RNA、ホスホエノールピルベート、ピルビン酸キナーゼ、ポリウリジル酸の混合液を使用し、混合液Bとして、リボソーム、可溶性蛋白因子類、tRNAの混合液を使用した。

【0031】図7に示すように、この実験に用いたマイクロリアクタの注入ポート14は、混合液A用の第1ポート14aと混合液B用の第2ポート14bとからなり、チャンネル13は、第1ポート14aと第2ポート14bを連通する合流用チャンネル13aと、合流用チャンネル13aと排出ポート15を連通する反応チャンネル13bとからなる。また、このシリコン基板12を37℃に保持した温水に浮かして、反応チャンバ11（すなわち反応チャンネル13b）と排出ポート15の温度を熱電対で計測した。反応中、マイクロリアクタを除くすべての機器は2℃～4℃の低温に保持し、マイクロリアクタ以外での反応を防止した。

【0032】反応は、2つの混合液A、Bを等量混合することで引き起こされた。この等量混合は、マイクロシリンジ21を用い、0.05μL/minの一定流量で100分間行った。マイクロリアクタの排出ポート15から排出された混合反応液はフィルタ紙22（Whatmann 3mm）に集め、10%のTCA液（trichloroacetic acid）で20分間煮沸し、更に、同液で10分間2回、常温で洗浄し、更にエタノールで10分間2回、常温で洗浄した。乾燥後、フィルタ紙22に残留した不溶性TCAの放射性を計測した。計測は、混合液AにメッセンジャーRNAとしてのポリウリジル酸（Polyuridylic acid）を含むものと、含まないものを同一条件で試験した。

【0033】図8は、図7の試験結果を示す図である。この図において、横軸は、¹⁴Cの検出量であり、縦軸の（a）はmRNAを含まない場合、（b）はこれを含む完全な場合である。（b）の完全なシステムでは、（b）のmRNAを含まない場合に比較して、約2倍の¹⁴Cを検出している。従って、mRNAにより¹⁴Cの取り込みが強化されること、及びmRNA上の遺伝暗号に対応した蛋白質（ポリフェニルアラニン）の合成がマイクロリアクタ内で成功したことがわかる。

【0034】なお、本発明は上述した実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲で種々変更できることは勿論である。

【0035】

【発明の効果】上述したように、本発明の生化学反応用

マイクロリアクタは、例えば1000以上の多数の生化学反応を同時に並列的に行うことができ、かつ、単なる分析だけではなく、蛋白質合成などの物質合成反応をもセル上で行うことができる、等の優れた効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のマイクロリアクタの概念を模式的に示す図である。

【図2】図1と同様の概念図である。

【図3】本発明のマイクロリアクタの実施形態を示す図である。

【図4】図3の製造方法を示す図である。

【図5】図3のマイクロリアクタを用いた第1実験例である。

【図6】図5の試験結果を示すディスプレイ上に表示した中間調画像である。

【図7】図3のマイクロリアクタを用いた第2実験例である。

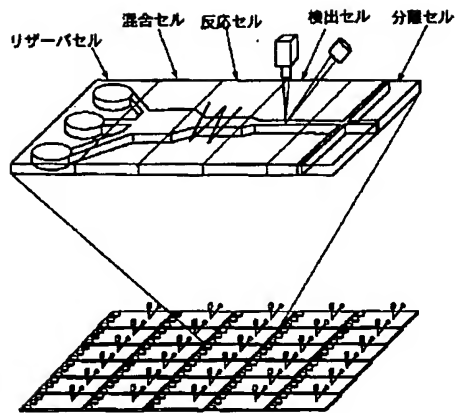
【図8】図7の試験結果を示す図である。

【図9】従来のマイクロリアクタの構成図である。

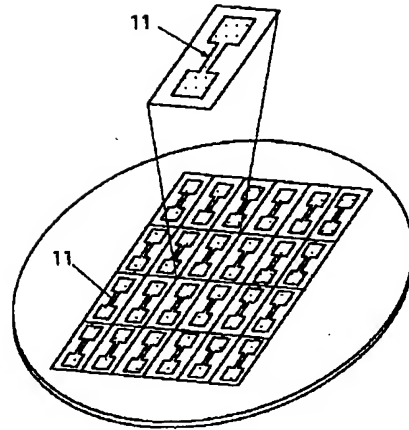
【符号の説明】

- 1 マイクロ化学反応器
- 2 電源/制御システム
- 3 注射器
- 4 シリコンゴムの窓
- 5 電磁コイル
- 6, 7 電極
- 11 反応チャンバ
- 12 シリコン基板
- 13 チャンネル
- 13a 合流用チャンネル
- 13b 反応チャンネル
- 14 注入ポート
- 14a 第1ポート
- 14b 第2ポート
- 15 排出ポート
- 16 貫通孔
- 17 平板（耐熱ガラス）
- 18 ハトメ
- 19 シリコンチューブ
- 21 マイクロシリンジ
- 22 フィルタ紙

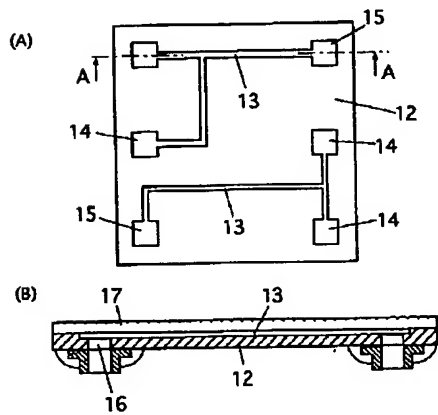
【図1】



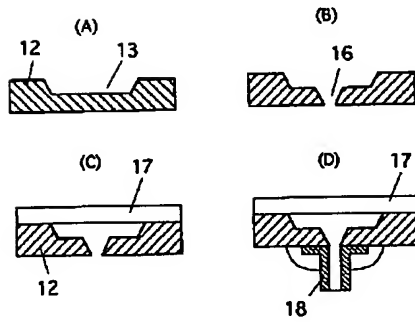
【図2】



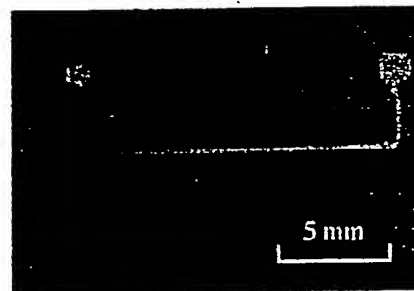
【図3】



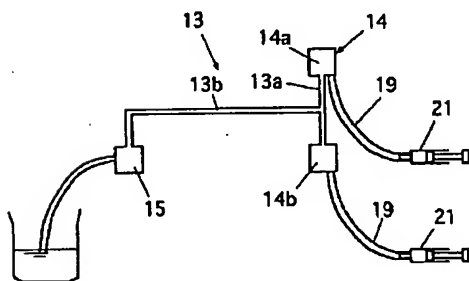
【図4】



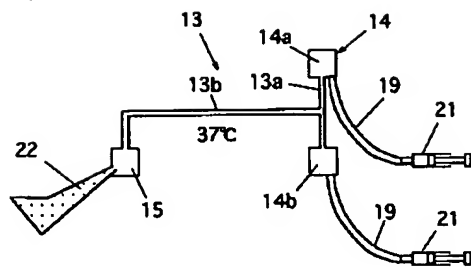
【図6】



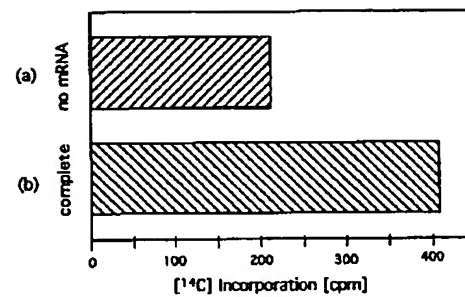
【図5】



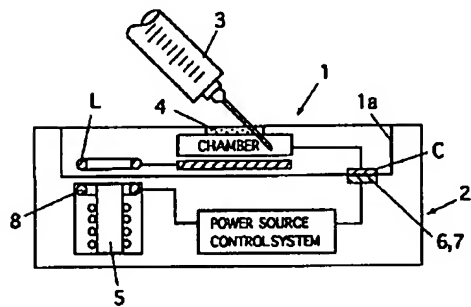
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 遠藤 勲
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72)発明者 庄子 習一
埼玉県所沢市松葉町25-19-205

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☒ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE RI ANK (USPTO)